

육군자탕가감방 에탄올 추출물의 비만 및 고지혈증 유도 환쥐에 대한 억제효능

박정현¹ · 강 희² · 안광석¹ · 심범상¹ · 김성훈³ · 최승훈¹ · 안규석^{1,4*}

1: 경희대학교 한의과대학 병리학교실 & 경희대학교 한의학 연구소, 2: 경희대학교 동서의학대학원 동서외과학,
3: 압예방소재개발연구센터, 4: BK21 경희대학교 한의과학사업단

Inhibitory Effects of Ethanol Extract of Modified Yukgunga-tang on Obesity and Hyperlipidemia in Rats Induced by High Fat Diet

Jung-Hyun Park¹, Hee Kang², Kwang Seok Ahn¹, Bumsang Shim¹,
Sung Hoon Kim³, Seung Hoon Choi¹, Kyoo Seok Ahn^{1,4*}

1: Department of Pathology, College of Oriental Medicines & Institute of Oriental Medicine,

2: Department of East-West Medical Science, Graduate School of East-West Medical Science,

3: Cancer Preventive Material Development Research Center, 4: Brain Korea 21 Oriental Medical Science Center, Kyunghee University

This experimental study was designed to investigate the inhibitory effects of ethanol extract of modified Yukgunja-tang(mYGJT) on high-fat diet-induced obesity and hyperlipidemia in Sprague-Dawley rats. Animals were divided into normal, control, mYGJT(100 mg/kg and 200 mg/kg) treated groups. Obesity with hyperlipidemia was induced by high fat diet treatment for 6 weeks. mYGJT was given to the animals by oral gavage for 4 weeks, starting at the high-fat diet regimen. The effect of mYGJT on the differentiation of 3T3 L1 adipocytes in vitro and serological paramamters for obesity and hyperlipidemia in vivo were evaluated. mYGJT significnatly inhibited the differentiation of 3T3 L1 adipocytes in a concentration dependent manner. mYGJT treatment signifcantly reduced body weight, abdominal and epididymal fat weight, and FER(Food Efficiency Ratio) compared with control group in a dose dependent manner. It also significantly inhibited the levels of serum total lipid, triglyceride, phospholipid, total cholesterol, LDL, AI(Atherosclerosis Index) and returned the serum HDL to normal. Total lipids, triglycerides and cholesterol in the liver, as well as malondialdehyde(MDA) and hydroxy radical in the serum were significantly reduced. However, superoxide dismutase(SOD) activity was significantly increased in mYGJT treated group compared with control group. Finally, mYGJT treatment significantly decreased the MDA and protein carbonyl concentrations of the hepatic homogenate but significantly increased the activities of SOD, GSH-Px and Catalase. Taken together, these results suggest that mYGJT can be clinically useful in inhibiting high-fat diet-induced obesity and hyperlipidemia.

Key words : mYGJT, modified Yukgunja-tang, obesity, hyperlipidemia, high fat diet

서 론

최근 경제 발전에 따른 음식 및 생활습관의 변화와 인구의 고령화 및 각종 스트레스와 운동부족으로 인한 糖尿病, 高脂血症, 高血壓 등의 질환에 肥滿이 크게 관여하고 있다¹⁾. 肥滿은 糖尿病과 高血壓의 위험 인자이며, 糖尿病 환자에게서 발생한 高血

* 교신저자 : 안규석, 서울시 동대문구 회기동 1, 경희대학교 한의과대학

· E-mail : ahnks@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-0335

· 접수 : 2009/05/14 · 수정 : 2009/05/21 · 채택 : 2009/06/11

壓은 糖尿病의 예후를 악화시키므로 糖尿病 환자의 肥滿, 고인슐린혈증, 高血壓의 관계에 대한 이해가 필요하다²⁾.

나이가 들고 체중이 증가하면서 혈액의 중성지방과 콜레스테롤 수치는 증가하게 된다. 중성지방은 피하지방의 주성분으로 체내에 축적되어 비만을 유발하는데, 그 수치는 肥滿度와 비례한다. 콜레스테롤은 몸에 있는 지질의 일종으로 지방산과 결합되어 있는 에스터형과 유리형이 있으며, 초밀도지단백 (very low density lipoprotien, VLDL), 저밀도지단백(low density lipoprotein, LDL), 고밀도지단백(high density lipoprotein, HDL)

으로 분류할 수 있다³⁾.

비만은 체지방이 과도하게 축적되는 것으로 대사 장애를 동반하며 몸에서 사용하는 것보다 흡수하는 열량이 많기 때문에 생긴다. 과식과 운동 부족에서 오는 단순성 비만과 유전적 요인, 내분비질환, 신경과적인 요인 등에 의해 2차적으로 발생하는 증후성 비만으로 나누어진다⁴⁾. 이에 대한 치료방법으로는 식사요법, 운동요법, 행동 수정요법, 이화요법, 인지 행동요법, 약물요법 및 수술요법 등이 있다⁵⁾.

肥滿에 대하여 『素問 通評虛實論』에서는 “肥貴人 卽膏粱之疾也.”이라 하여 肥滿의 원인을 제시하였고, 『傳書註女科』에서는 “身體肥滿 痰涎深多, 洩水化痰”이라하여 氣機가不利하여 痰涎이 壅盛한 것으로 洩水, 化痰法을 사용해야 한다고 하였다. 治法으로 化濕, 利水, 祛痰, 消導, 疎肝利膽, 健脾, 溫陽 등이 있으며 약물요법으로는 防己黃芪湯, 五苓散, 二陳湯, 桃仁承氣湯, 防風通聖散, 大柴胡湯, 六君子湯 등의 處方이 사용되고 있다.

본 研究에 활용된 육군자탕가감방의 구성은 六君子湯과 五苓散을 合方과 加減한 것으로 六君子湯은 健脾養胃하는 四君子湯에 燥濕化痰하는 二陳湯을 合方한 方劑이다⁶⁾. 『醫學正傳』의 “治痰挾氣虛發食⁷⁾.”이라는 내용에 관련하여 許⁸⁾는 氣虛痰盛에 汪⁹⁾은 氣虛有痰에 사용하였고, 『景岳全書』에서는 “人多氣虛之證 然肥人多濕多滯 故氣道多有不利 若果痰氣壅滯, …(中略)… 宜四君六君.”¹⁰⁾이라 하여 氣虛多濕多滯한 肥人들의 治方으로 六君子湯을 응용하였으며, 現代에도 이에 대한 지속적인 研究가¹¹⁻¹³⁾ 발표되었고, 五苓散은 化氣利水 滲濕하는 효능이 있어서 小便不利를 治療하는 중요한 方劑이며¹⁴⁾, 근래에는 泌尿器系 疾患 및 肥滿證의 治療에도 應用되고 있으며, 이에 대한 研究¹⁵⁻¹⁷⁾가 발표된 바 있다.

또한 李 등²¹⁾은 초기진단 高脂血症 患者의 식습관 조사와 양과가루 섭취가 血中脂質에 미치는 영향 등의 研究^{18-20,22)}에서 食品중에서 양과의 콜레스테롤을 抑制효능을 입증하였으며, 裴²³⁾는 “다이어트 샐러드와 소스만들기”에서 양배추 다이어트 에 대하여 보고되고 있다.

이에 著者는 肥滿의 원인을 濕과 熱의 實證으로 판단하여 치료하는 太陰調胃湯을 根幹으로 한 研究와 달리 氣虛證을 치료하면서 利水作用을 원활하게 하는 肥滿治療를 위하여 上記 處方 및 食品의 合方과 加減을 통해서 더욱 우수한 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각하였다.

이에 本 實驗에서는 육군자탕가감방 에탄올 추출물이 高脂 肪食餌로 유발된 흰쥐에서 肥滿 및 高脂血症 抑制 효과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물 및 사육환경

본 시험에 사용한 SPF 25 ± 3 g의 ICR계 웅성 생쥐 및 140 ± 10 g의 Sprague Dawley(SD)계 흰쥐[(주) 효창사이언스로부터 4주령의 수컷을 구입한 후 1주일 간 검역과 순화·사육을 거쳐

건강한 동물만을 실험에 이용하였다. 본시험의 사육환경은 온도 22±3℃, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간(07:00~19:00)로 설정된 실험동물 사육실(TECNIPLAST, Italy)에서 실시되었다. 사료는 실험동물용 고품사료(중앙실험동물, 서울)를 음수는 상수도를 자유 섭취시켰다. 실험 시간 전 24시간 동안 물만 주고 절식하였다. 이때 효소 활성의 일중 변동을 고려하여 실험동물을 일정시간(오전 10:00-12:00) 내에서 처치하였다.

2) 재료 및 시료준비

본 시험에 사용된 약재는 본디을 한의원 네트워크에서 사용하는 약재를 구입한 후 정선하여 사용하였으며, 농산물은 유기농 제품을 사용하였다. 육군자탕가감방의 처방 구성은 다음과 같다 (Table 1). 시료는 육군자탕가감방 1056 g을 에탄올 4 L에 3일간 여과 및 추출하여 감압농축 후 동결건조를 하여 96.8 g(수율 =9.167%)의 분말을 얻었다.

Table 1. Prescription of modified Yukgunja-tang(mYGJT)

Herbal Name	Scientific Name	Country	dose (g)
澤瀉 (Alismatis Rhizoma)	<i>Alisma Plantago Linne. parviflorum Torr.</i>	국산 전남 순천	10
半夏 (Pinelliae Rhizoma)	<i>Pinellia ternata Breitenbach</i>	북한산	6
赤茯苓 (Hoelen)	<i>Poria cocos Wolff</i>	국산	6
白朮 (Atractylodis Macrocephalae Rhizoma)	<i>Atractylodes macrocephala Koidzumi</i>	국산 경북 영천	6
豬苓 (Polyporus)	<i>Polyporus umbellatus</i>	국산 경북 영천	6
橘皮 (Aurantii nobilis Pericarpium)	<i>Citrus nobilis Makino</i>	중국산	4
白茯苓 (Hoelen)	<i>Poria cocos Wolff</i>	국산	4
人蔘 (Ginseng Radix)	<i>Panax ginseng C.A. Mey</i>	국산	4
炙甘草 (Glycyrrhizae Radix)	<i>Glycyrrhiza uralensis Fischer et. De Candolle</i>	중국산	2
生薑 (Zingiberis Rhizoma)	<i>Zingiber officinale Roscoe</i>	국산	4
양파	<i>Allium cepa</i>	국산	4
양배추	<i>Brassica oleracea var. capitata</i>	국산	8
Total Amount			64

2. 방법

1) 지방세포분화 및 측정

3T3-L1 adipocyte는 6-well plates에서 배양하였고, 세포를 분화시키기 직전에 1 μM dexamethasone와 10 μg/ml insulin, 0.5 mM IBMX 을 처리한 후 48시간 동안 분화를 유도하였다. 이틀 후 5 μg/ml insulin이 포함된 DMEM배지에서 일주일 동안 배양한 후, 이것이 adipocyte로 분화된 후 육군자탕가감방을 처리하였다. 10일째에 Oil-Red O dye로 세포를 염색한 후 사진을 찍고 isopropanol에 녹인 다음 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 고지방식으로 인한 비만 및 고지혈증의 유발

실험동물의 비만 및 식이성 고지혈증의 유발은 beef tallow를 첨가한 조제 시료를 6주간 사육하여 유발시켰다(Table 2).

Table 2. Composition of basal and hyperlipidemic diets

Ingredient	Basal Diet(%)	Hyperlipidemic Diet(%)
Casein	20.0	20.0
DL-Methionine	0.3	0.3
Corn Starch	15.0	15.0
Sucrose	50.0	34.5
Fiber ¹⁾	5.0	5.0
Corn oil	5.0	-
AIN-mineral Mixture ²⁾	3.5	3.5
AIN-vitamin Mixture ³⁾	1.0	1.0
Choline Bitartrate	0.2	0.2
Beef Tallow	-	20.5

1) Cellulose : Sigma Co. LTD., USA. 2) Mineral mixture based on the pattern of Rogers and Haper(1965) contain the following (g/kg diet): calcium phosphate dibasic 500.0, sodium chloride 74.0, potassium citrate monohydrate 220.0, potassium sulfate 52.0, magnesium oxide 24.0, magnesium carbonate 3.5, ferric citrate 6.0, zinc carbonate 1.6, cupric carbonate 0.3, potassium iodate 0.01, chromium potassium sulfate 0.55, sucrose, finely powdered make 1,000. 3) Vitamin mixture(g/kg diet): thiamine HCl 0.6, biotin 0.02, riboflavin 0.6, cyanocobalamin 0.001, pyridoxine HCl 0.7, retinyl acetate 0.8, nicotinic acid 3.0, DL-tocopherol 3.8, Ca-pantothenate 1.6, 7-dehydrocholesterol 0.0025, folic acid 0.2, methionine 0.005, sucrose, finely powdered make 1,000

3) Poloxamer-407과 Triton WR-1339 투여로 인한 급성 고지혈증 유발

육군자탕가감방을 생리식염수로 희석한 4% tween 80에 100, 200 mg/kg 용량으로 고지방식 시작과 동시에 4주간 각각의 실험군에 경구용 needle zonde를 사용하여 투여하였다. 고지방식 시작후 6주째에 Wout등의 방법에 따라 poloxamer-407(300 mg/kg)을 ice bath에서 생리식염수에 용해하여 생쥐의 복강 내에 투여하고 24시간 후에 처사하였다. Triton WR-1339 투여 유발 고지혈증 흰쥐에 미치는 영향은 Kusama등의 방법에 준하여 Triton WR-1339 투여 16시간 전부터 절식시킨 후 Triton WR-1339 200 mg/kg를 꼬리정맥에 주사하여 고지혈증을 유발시킨 후 18시간 후에 CO₂ gas로 마취하여 채혈하고 고지혈증 관련 생화학지표를 측정하였다.

4) 혈청 및 효소원의 조제

고지방식 시료를 투입한지 6주후 실험동물에 sodium phenobarbital 200 mg/kg를 복강 주사하여 마취시킨 후 bleeding time을 측정하였다. 측정 후 CO₂로 가볍게 마취시켜 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하였고, 채취한 혈액은 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하여 지질, lipid peroxide, hydroxyl radical 함량 및 superoxide dismutase 활성 측정에 사용하였다. 간 조직은 생리식염수로 관류시켜 조직 내 혈액을 제거하고, 간 조직을 적출하여 생리식염수로 씻은 다음 여과지로 조직에 남아 있는 혈액 및 기타 이물질을 제거하고 간 조직을 1 g당 4배량의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 가하고 4℃에서 glass teflon homogenizer로 분쇄하였다. 이 분쇄액은 homogenate분획으로 하였으며, 이 분획을 4℃ 원심분리기로 600×g에서 10분간 원심 분리하여 핵 및 분쇄 부분을 제거한 상등액을 다시 고속 원심분리기로 10000 × g에서 20분간 원심분리 하였다. 간 조직의 침전물은 동량의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4)용액을 가하고 신장과 폐조직의 침전물은 동일한 양의 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)용액을 가하여 현탁시킨 시료액을 다시 10000 × g에서 30분간 원심분리하여 mitochondria분획을 얻었다.

다. 상등액은 다시 105000 × g에서 60분간 초원심분리하여 얻은 상등액을 cytosolic분획으로 그 침전물에 동일한 양의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4)와 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)을 각각 첨가하여 현탁시켰다. 이 시료액을 다시 105000 × g에서 60분간 원심분리하여 microsomal 분획을 얻었다. 이렇게 얻어진 homogenate분획에서는 lipid peroxide 함량을 측정하였고, cytosol분획에서는 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase활성 측정의 효소원으로 사용하였다.

- 체중 및 지방 조직의 무게 측정 : 체중 변화는 실험 개시일로부터 1주일마다 측정하였으며, 지방 조직의 무게는 복강 및 고환 주위의 지방을 채취하여 산출하였다.

- 간 조직중 지질 함량측정 : Folch와 Stanley의 방법을 이용하여 중성지방과 콜레스테롤 측정용 효소시약으로 유화제로서 0.5% triton X-100과 3 mM sodium cholate를 혼합하여 간 조직의 지질함량을 측정하였다.

5) Total cholesterol 함량 측정

Richmond 등의 효소법에 의하여 조제된 kit(AM 202-K, Asan)를 사용하여 실험하였다. 4℃에서 효소시약(cholesterol esterase 20.5 U/ℓ, cholesterol oxidase 10.7 U/ℓ, sodium hydroxide 1.81 g/ℓ 함유)을 효소시약 용해액(potassium phosphate monobasic 13.6g/ℓ, phenol 1.88 g/ℓ 함유)에 용해한 용액에 시료 20 μℓ에 조제한 효소시약 3.0 ml을 첨가한 후 37℃에서 5분간 incubation하여 시약 blank를 대조군으로 정하고 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선에 준해 혈중 함량은 mg/dℓ로 표시하였다.

6) Triglyceride 함량 측정

McGowan 등의 방법에 준하여 조제된 kit(AM 157S-K, Asan)를 사용하여 실험하였다. 4℃에서 효소시약(lipoprotein lipase 10800 U, glycerol kinase 5.4 U, peroxidase 135000 U, L-α-glycero phosphooxidase 160 U 함유)을 효소시약 용해액 [N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminomethane sulfonic acid 0.427 g/dℓ 함유]에 용해한 용액에 시료 20 μℓ에 조제한 효소시약 3.0 ml을 첨가한 후 37℃에서 10 분간 incubation하여 시약 blank를 대조군으로 정하고 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선에 준해 혈중 함량은 mg/dℓ로 표시하였다.

7) Phospholipid 함량 측정

Chen 등의 효소법에 의하여 조제된 kit(Iatron Chem. Co.)를 사용하여 실험하였다. 4℃에서 효소시약(phospholipase 3.9 U, choline oxidase 5.6 U, peroxidase 3.6 U, 4- aminoantipyrine 0.3252 mg 함유)을 효소시약 용해액 [tris(hydroxymethyl)-aminomethane 6.057 mg 함유]에 용해한 용액에 시료 20 μℓ에 조제한 효소시약 3.0 ml을 첨가한 후 37℃에서 20분간 incubation하여 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선에 준해 그 함량을 mg/dℓ로 표시하였다.

8) High density lipoprotein-cholesterol(HDL-C) 함량 측정

Noma등의 효소법에 의하여 조제된 kit(AM 203-K, Asan)를 사용하여 실험하였다. 혈청 20 μℓ에 침전시약(dextran sulfate

0.1%, magnesium chloride 0.1 M 함유) 0.2 ml를 가하고 잘 혼합한 후 실온에서 10분간 방치하고 3000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 그 상층액을 0.1 ml취하여 효소시액 3.0 ml와 잘 혼합하여 37°C에서 5분간 incubation하여 시약 blank를 대조군으로 정하고 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선에 준해 그 함량을 mg/dl로 표시하였다.

9) LDL-cholesterol 함량 측정

Low density lipoprotein-cholesterol(LDL-C) 함량은 Friedwald 등의 방법에 따라 다음의 식에 의하여 산출하였다.

$$\text{LDL-C} = [\text{총콜레스테롤양} - (\text{HDL-C} + \text{Triglyceride양}/5)]$$

10) 혈중 Lipid peroxide 함량 측정

Yagi 등의 방법에 따라 혈청 20 μl 에 1/12 N H₂SO₄ 4.0 ml를 가하여 혼합하고 10% phosphotungstic acid 0.5 ml를 가하여 실온에서 5분간 방치한 후 원심분리 하여 침전물인 혈청단백질만 취해서 다시 1/12 N H₂SO₄ 2.0 ml와 10% phosphotungstic acid 0.3 ml를 첨가하여 원심분리 하였다. 침전물만을 취하여 증류수 4.0 ml와 0.67% thiobarbituric acid와 acetic acid를 1:1로 혼합한 용액을 1.0 ml를 가하고 95°C에서 60분간 반응시켜 실온에서 냉각 후 n-BuOH을 5.0 ml를 첨가하여 3000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 생성된 홍색의 n-BuOH을 취해 spectrofluorometer를 사용하여(Ex : 515 nm, Em : 553 nm) 흡광도를 측정하였다. 표준 용액으로 tetraethoxypropane 0.5 nmole을 같은 방법으로 반응시켜 흡광도를 측정하고 다음의 식에 의해 혈청 lipid peroxide함량을 산출하였다.

$$\begin{aligned} & \text{Serum lipid peroxide(nmole/ml serum)} \\ & = 0.5 \times (\text{sample의 흡광도} / \text{표준용액의 흡광도}) \times 1.0 / 0.02 \end{aligned}$$

11) 혈중 hydroxyl radical 함량 측정

Kobatake 등의 방법에 따라 혈청 34.8 μl 에 0.54 M NaCl, 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4), 10 mM NaN₃, 7 mM deoxyribose, 5 mM ferrous ammonium sulfate 및 증류수로서 333.3 μl 가 되도록 첨가하여 vortex에서 잘 혼합하여 37°C에서 15분간 정치하였다. 혈청 67 μl 를 취하고 여기에 8.1% sodium dodecyl sulfate 75 μl , 20% acetic acid 500 μl 및 2차증류수 25 μl 를 넣어 혼합하였다. 여기에 다시 1.2% thiobarbituric acid 333 μl 를 가하여 water bath(100°C)에서 30 분간 가열한 후 실온에서 냉각한 다음 700 × g에서 5분간 원심분리 하여 얻은 상층액을 파장 532 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선에 의하여 hydroxyl radical(nmole/mg protein)의 함량을 정량하였다.

12) 혈중 superoxide dismutase(SOD) 활성 측정

Mirsa와 Fridovich의 방법에 따라 정량하였다. 혈청을 일정량 반응액[1 mmol / L adrenalin(pH 2), 50 mmol/L glycin(pH 10.2)]에 첨가하고 30°C에서 3분간 반응시킨 후 480 nm에서 생성되는 adrenochrome의 생성량을 측정하였다. 효소의 활성도는 SOD의 U/g protein으로 표시하였다. SOD의 1 Unit는 50% 억제

되는 adrenochrome의 생성율로서 산출하였다.

13) 간조직의 지질 및 단백질 산화정도 측정

Ohkawa등의 방법을 변경하여 간, 신장, 폐 조직 1 g당 4배량의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 첨가하여 분쇄하고, 이 분쇄액에 동일한 buffer를 동일한 양으로 첨가하여 3 시간 pre-incubation시킨 후 8.1% sodium dodecyl sulfate와 20% acetate buffer(pH 3.5) 및 발색의 목적으로 0.8% thiobarbituric acid를 첨가한 후 95°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이를 실온에서 냉각 후에 n-BuOH : Pyridine (15:1)을 첨가하여 15분간 원심분리하여 생성된 홍색의 n-BuOH : pyridine 층을 취하여 파장 532 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 이때 표준물질로 1,1,3,3-tetramethoxypropane(TMP)를 사용하였으며, 측정된 값은 표준곡선에 대입시켜 malondialdehyde(MDA)의 양으로 환산하였다. 단백질 산화는 Oliver등의 방법에 준하여 DNPH(2,4-dinitrophenyl hydrazine)를 이용하여 카르보닐 그룹의 함량을 측정하였다. 카르보닐 농도는 Livine등의 방법에 따라 370 nm에서 각 시료의 흡광도를 측정 후 지방족 하이드라존 화합물의 평균분자흡광계수를 22,000으로 삼아 카르보닐 그룹의 몰수로 산정하였다.

14) 간장 효소 활성 측정

(1) SOD 활성도 측정

Oyanagui의 방법에 준하여 Cytochrome c, 2 μM xanthine sodium, 50 mM sodium phosphate buffer의 기질액에 효소액을 넣고 안정화 시킨 후 xanthine oxidase 50 μl 를 넣고 흡광도를 사용하여 550 nm에서 2분간의 흡광도를 측정하였다. Xanthine/xanthine oxidase반응으로 생성된 superoxide anion에 의해 cytochrome c가 환원되는 것을 측정하는데, SOD에 의해 superoxide anion의 양이 감소하여 cytochrome c의 변화 속도를 현상을 이용하여 SOD활성을 측정하였다. Cytochrome c의 환원을 50% 억제하는 양을 SOD의 1 unit로 정의하였다.

(2) Catalase 활성도 측정

Aebi의 방법에 준하여 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)중에 기질인 10 mM H₂O₂의 환원되는 정도를 파장 240 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 분자흡광계수 0.041 mM-1cm-1을 이용하여 활성도를 산정하였다. 효소 활성의 단위는 1분당 1 mg protein이 분해하는 hydrogen peroxide의 양을 μmole 로 표시하였다.

(3) Glutathione peroxidase(GSH Px) 활성도 측정

Pagila와 Valentine의 방법에 준해 hydrogen peroxide, glutathione 및 NADPH가 함유된 0.1 mM Tris buffer(pH 7.2) 중에 효소액을 가하여 파장 340 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 곡선에 준하여 활성도를 산정하였다. 효소 활성의 단위는 1분당 1 μM NADPH를 산화시키는 효소의 양으로 정의하였다. 당 1 mg protein이 생성하는 NADP의 양을 nmole로 표시하였다.

15) 단백질 정량 및 통계처리

단백질의 함량은 Lowry 등의 방법에 준하여 bovine serum albumin(Sigma, Fr. V)을 기준으로 하여 측정하였다. 본 실험에서 얻어진 결과는 평균치±표준편차로 표시하였고, 통계적 유의

성 검증은 Duncan's multiple range test로 그 유의성을 나타내었다.

결 과

1. 지방세포분화에 대한 효과

분화를 유도한 후 배양한 3T3 L1 adipocyte에 육군자탕가감방을 투여한 결과, 지방체의 염색에서 농도의존적인 감소 효과를 확인할 수 있었으며(Fig. 1), Oil-Red O의 염색에 의한 지방체의 발현에서도 농도의존적인 뚜렷한 억제 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 2).

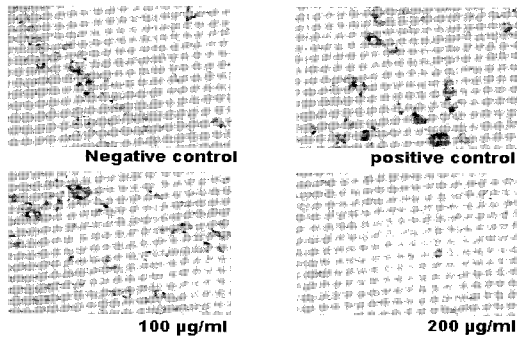


Fig. 1. Photographs of 3T3 L1 adipocyte differentiation in untreated or mYGJT treated group. The cells were plated in 6-well plates. On day 2, the differentiation of confluent adipocyte cells was induced with hormone cocktail media containing 1 µM dexamethasone, 5 µg/ml insulin, and 0.5 mM IBMX for 2 days. After 2 days, the medium was changed with the regular medium, and on day 10, the cells were treated with 100 µg/ml, 200 µg/ml of mYGJT.

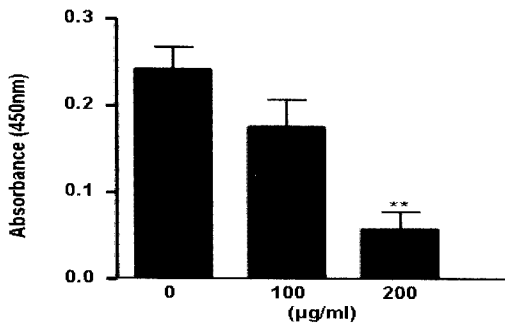


Fig. 2. Effect of mYGJT on the differentiation of 3T3 L1 adipocyte. On day 10 after adipocyte differentiation induction, the cells were stained with Oil-Red O dye. The cells were fixed with 70% ethanol and dehydrated with 100% propylene glycol. The cells were stained with Oil-Red O and with Harris hematoxylin. Fat droplets in adipocytes were stained red. Cells were seeded on 96-well microplates at a number of 4000 cells/well and incubated with mYGJT for the indicated time period. Supernatant was discarded and then cells were incubated with 100 µl MTT solution (2 mg/ml MTT in PBS) for 4 h. Absorbance was measured using a microplate-reader (Molecular Device, MN, USA).

2. Poloxamer-407 처리 고지혈증 모델의 혈청지질에 대한 효과

Table 3에 제시된 바와 같이 triglyceride함량이 정상군은 97.2±18.18 mg/dl인데 비하여 대조군은 1213.9±161.99 mg/dl로 약 10배 이상 증가되었으며, 육군자탕가감방투여군은 대조군에 비해 현저히 감소되었다. T-Cholesterol활성에서는 정상군은 67.3±9.06 mg/dl로 대조군 810.5±81.68 mg/dl로

triglyceride함량 같이 증가하였으며, 반면 육군자탕가감방 투여군에서는 현저한 감소 효과를 보였다.

Table 3. Effect of mYGJT on the serum lipid levels in poloxamer-407 treated hyperlipidemia in mice

Treatment	Dose (mg/kg)	mg / dl	
		Triglyceride	T-Cholesterol
Normal		97.2 ± 18.18 ^c	67.3 ± 9.06 ^c
poloxamer-407		1213.9 ± 161.99 ^a	810.5 ± 81.68 ^a
mYGJT	100	1146.5 ± 81.86 ^b	783.6 ± 44.17 ^b
	200	1035.9 ± 81.34 ^b	767.8 ± 45.02 ^b

Animals were orally administered with mYGJT daily for consecutive four weeks. High-fat diet was given simultaneously to the treatment of mYGJT and lasted for 6 weeks. Animals were sacrificed 24 hrs after the i.p. poloxamer-407 treatment at the 6th week. Values represent mean ± S.D.(n=6). Values sharing the same superscript letter are not significantly different from each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

3. Triton WR-1339 처리 고지혈증 모델의 혈청지질에 대한 효과

Table 4에 제시된 바와 같이 triglyceride함량이 정상군은 98.5±17.56 mg/dl인데 비하여 대조군은 771.3±53.97 mg/dl로 약 8배 이상 증가되었으며, 육군자탕가감방투여군은 대조군에 비해 현저히 감소되었다. T-Cholesterol활성에서는 정상군은 70.3±8.54 mg/dl로 대조군 200.4±19.41 mg/dl로 triglyceride함량 같이 증가하였으며, 반면 육군자탕가감방 투여군에서는 현저한 감소 효과를 보였다.

Table 4. Effect of mYGJT on the serum lipid levels in triton WR-1339(TWR) treated mice

Treatment	Dose (mg/kg)	mg / dl	
		Triglyceride	T-Cholesterol
Normal		98.5 ± 17.56 ^c	70.3 ± 8.54 ^c
Triton WR-1339		771.3 ± 53.97 ^a	200.4 ± 19.41 ^a
mYGJT	100	710.8 ± 36.88 ^b	185.6 ± 13.8 ^b
	200	671.5 ± 30.10 ^b	171.3 ± 17.80 ^b

Animals were orally administered with mYGJT daily for consecutive four weeks. High-fat diet was given simultaneously to the treatment of mYGJT and lasted for 6 weeks. Animals were sacrificed 24 hrs after the i.p. TWR treatment at the 6th week. Values represent mean ± S.D.(n=6). Values sharing the same superscript letter are not significantly different from each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

4. 체중 변화

Table 5에 제시된 바와 같이 정상군의 체중 증가 속도에 비례하여 대조군에서는 고지방식 투여 후 2주부터 유의한 체중 증가를 보였으나, 육군자탕가감방을 100 mg/kg과 200 mg/kg의 용량으로 투여한 실험군에서는 모두 고지방식 투여 3주후부터 유의한 체중감소 효과를 보였다. 그러나 고지방식 투여 6주후에는 정상군은 304.5±5.7 (g)이었으나, 대조군은 339.7±6.5 (g)으로 유의한 증가를 보였고, 육군자탕가감방 100 mg/kg 및 200 mg/kg 투여군에서는 각각 320.8±3.8 (g) 및 314.5±4.1 (g)으로 나타나 대조군에 비해 용량 의존적으로 유의한 억제 효과를 보였다.

5. 지방 조직의 무게 변동

Table 6에 제시된 바와 같이 지방 조직의 무게 변동 중 retroperitoneal fat에서 정상군은 6.53±0.44 mg/g이었으나, 대조군에서는 11.27±1.19 mg/g으로 유의하게 증가되었다. 육군자탕가감방 100 mg/kg 및 200 mg/kg 투여군에서는 각각 10.25±0.88 mg/g, 9.83±0.43 mg/g으로 감소하여, 육군자탕가감방 200 mg/kg

고용량 투여군에서만 유의성이 인정되었다. Epididymal fat에서도 정상군에서는 7.31±0.44 mg/g이었으나 대조군에서는 10.53±0.91 mg/g으로 유의하게 증가되었으며, 육군자탕가감방 100 mg/kg 및 200 mg/kg 투여군에서는 각각 9.86±0.43 mg/g, 9.61±0.46 mg/g으로 나타나 모두 대조군에 비해 유의한 억제 효과를 보였다.

Table 5. Effect of mYGJT on the body weight in rats fed a normal and hyperlipidemic diet

Treatment	0	1	2	3	4	5	6
	weeks(g)						
Normal	145.3±4.6 ^a	158.7±3.6 ^c	188.3±5.7 ^b	235.2±5.7 ^c	263.4±4.5 ^d	286.4±4.8 ^d	304.5±5.7 ^d
Control	148.0±2.9 ^a	164.9±2.5 ^b	212.6±6.5 ^b	276.8±4.6 ^c	298.3±6.8 ^c	329.3±6.6 ^c	339.7±6.5 ^a
mYGJT 100 mg/kg	149.7±1.9 ^a	171.3±3.9 ^a	216.5±5.9 ^a	268.2±5.2 ^a	286.2±6.5 ^{ab}	314.3±3.5 ^{ab}	320.8±3.8 ^b
mYGJT 200 mg/kg	145.2±4.3 ^a	168.2±4.6 ^{ab}	215.7±4.4 ^a	261.4±3.9 ^{ab}	275.2±5.9 ^c	303.7±4.0 ^c	314.5±4.1 ^c

Rats were rendered obese by high fat diet for 6 weeks. mYGJT was orally administered daily for consecutive 4 weeks starting at the high fat diet regimen. Rats were killed 24hr after the last treatment of the diet. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different(p<0.05).

Table 6. Abdominal fat pad weight in the normal and diet-induced obesity rats fed mYGJT for 4 weeks

Treatment	Dose (mg/kg)	Retroperitoneal	Epididymal
		mg/g body weight	
Normal		6.53±0.44 ^c	7.31±0.44 ^c
Control		11.27±1.19 ^e	10.53±0.91 ^e
mYGJT	100	10.25±0.88 ^b	9.86±0.43 ^{bc}
	200	9.83±0.43 ^b	9.61±0.46 ^b

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different (p<0.05).

6. 혈청 지질 성분의 변화

Table 7에 제시된 바와 같이 대표적인 고지혈증 혈청 지질인 total lipid, phospholipid 및 triglyceride에 대한 평가 중 total lipid변화에서 정상군은 211.8±34.8 mg/dl이었으나, 대조군에서는 385.3±18.9 mg/dl으로 나타나 유의하게 증가되었다. 반면 육군자탕가감방 100 mg/kg 및 200 mg/kg 투여군에서는 각각 367.7±17.2 mg/dl, 325.6±19.7 mg/dl으로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. Phospholipid 변화에서는 정상군에 비하여 고지혈증을 유발한 대조군에서 증가하는 경향을 보였으며, 육군자탕가감방 200 mg/kg 고용량 투여군에서만 유의성 있는 감소를 보였다. 한편 triglyceride의 경우 phospholipid의 함량과 유사한 결과를 보였다.

Table 7. Effect of mYGJT on the concentration of serum lipids in rats fed a hyperlipidemic rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Total lipid	Phospholipid	Triglyceride
		mg/dl		
Normal		211.8±34.8 ^c	110.8±17.4 ^b	66.9±8.53 ^d
Control		385.3±18.9 ^a	142.2±19.4 ^a	176.5±10.05 ^a
mYGJT	100	367.7±17.2 ^a	139.8±17.3 ^a	153.8±7.80 ^b
	200	325.6±19.7 ^b	135.6±16.6 ^a	130.2±7.78 ^c

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different(p<0.05).

7. 혈청 cholesterol 함량 변화 및 동맥경화지수 변화

Table 8에 제시된 바와 같이 고지혈증의 유도도 total cholesterol 및 LDL-cholesterol함량이 대조군에서는 정상군에 비하여 각각 약 2배 정도 증가되던 것이 육군자탕가감방 200 mg/kg 고용량 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 보였다. 혈청 HDL-cholesterol함량에서는 대조군에서 정상군보다 약간 감소되던 것이 육군자탕가감방 투여군에서는 대조군에 비해 증가하였으며 거의 정상 수준으로 회복되는 경향을 보였다. 동맥경화지수도 대조군에서는 정상군에 비해 약 3배 정도 현저히 증가된 것이 육군자탕가감방 투여군에서는 유의성 있는 감소 효과를 보였다.

Table 8. Effect of mYGJT on serum cholesterol and AI in rats fed a hyperlipidemic diet

Treatment	Dose (mg/kg)	Cholesterol (mg/dl)			AI
		Total	HDL	LDL	
Normal		56.3±3.70 ^c	43.2±2.31 ^a	2.36±0.73 ^b	0.30±0.09 ^c
Control		81.3±5.60 ^a	40.7±2.92 ^a	5.47±0.85 ^a	0.98±0.11 ^a
mYGJT	100	77.2±4.70 ^{ab}	41.8±1.92 ^a	5.11±0.75 ^a	0.85±0.08 ^a
	200	73.8±3.94 ^c	42.0±1.35 ^a	4.92±0.97 ^a	0.76±0.08 ^b

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different(p<0.05). AI(Atherosclerosis Index) =(total cholesterol - HDL cholesterol) / HDL cholesterol

8. 간장 조직중의 지질 및 cholesterol 함량 변화

Table 9에 제시된 바와 같이 고지혈증 유도된 간 조직 중의 total lipid, triglyceride, cholesterol 함량이 대조군에서는 정상군에 비하여 각각 약 2~3배 정도 증가되던 것이 육군자탕가감방 투여군에서는 농도 의존적으로 감소 효과를 보였다.

Table 9. Effect of mYGJT on the hepatic lipid concentration of hepatic tissue of rat fed a hyperlipidemic diet

Treatment	Dose (mg/kg)	Total lipid	Triglyceride	Cholesterol
		mg/g of tissue		
Normal		14.5±1.39 ^d	9.46±0.83 ^c	2.53±0.45 ^d
Control		26.8±2.18 ^a	21.6±2.47 ^a	5.46±0.63 ^a
mYGJT	100	24.2±1.83 ^b	18.5±3.11 ^b	5.17±0.50 ^a
	200	21.8±2.01 ^c	17.5±1.56 ^b	5.06±0.37 ^{bc}

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different(p<0.05).

9. 혈중 과산화지질 생성 변화

Table 10에 제시된 바와 같이 혈중 lipid peroxide함량이 정상군은 25.7±3.11 MDA nmole/ml of serum인데 비하여 대조군에서는 48.6±5.19 MDA nmole/ml of serum으로 약 2배 정도 증가를 보이던 것이 육군자탕가감방 200 mg/kg 고용량 투여군에서는 39.7±2.18으로 현저한 감소 효과를 보였다.

10. 혈중 hydroxyl radical 생성 및 superoxide dismutase(SOD) 활성

Table 11에 제시된 바와 같이 혈중 hydroxyl radical함량이 정상군은 2.77±0.25 nmole/mg protein인데 비하여 대조군은 5.48±0.19 nmole/mg protein으로 약 2배 증가되었으며, 육군자탕

가감방 투여군은 대조군에 비해 hydroxyl radical생성이 현저히 감소되었다. 혈중 superoxide dismutase활성에서는 대조군은 1.96±0.12 unit/mg protein으로 정상군 3.27±0.41 unit/mg protein 보다 억제된 반면, 육군자탕가감방 투여군에서는 고지혈증 유도 군에 비하여 현저한 증가 효과를 보였다.

Table 10. Effect of mYGJT on the blood lipid peroxide in rats fed a hyperlipidemic diet

Treatment	Dose (mg/kg)	Content	
		MDA nmole/ml of serum	
Normal		25.7±3.11 ^c	
Control		48.6±5.19 ^d	
mYGJT	100	42.3±3.45 ^d	
	200	39.7±2.18 ^d	

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different(p<0.05).

Table 11. Effect of mYGJT on the serum hydroxyl radical and superoxide dismutase activities in rat fed a hyperlipidemic diet

Treatment	Dose (mg/kg)	Hydroxyl radical	SOD Activity
		nmole/mg protein	U/g protein
Normal		2.77±0.25 ^c	3.27±0.41 ^a
Control		5.48±0.19 ^d	1.96±0.12 ^b
mYGJT	100	5.13±0.26 ^{cd}	2.05±0.28 ^{bc}
	200	5.06±0.33 ^d	2.21±0.16 ^c

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different(p<0.05). SOD 1 Unit : Defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation to 50%

11. 간 조직의 지질 및 단백질 산화 정도

Table 12에 제시된 바와 같이 간 조직에서의 지질과산화 함량이 정상군은 14.8± 4.25 MDA nmole/mg protein, 대조군에서는 33.9±2.67 MDA nmole/mg protein으로 나타나 정상군에 비하여 약 3배 정도 증가를 보였다. 이에 비해 육군자탕가감방 100, 200 mg/kg 투여군에서는 각각 30.7±3.19 MDA nmole/mg protein, 29.2±4.17 MDA nmole/mg protein으로 나타나 대조군에 비하여 간 조직의 지질과산화 함량이 현저히 억제된 결과를 보였다. 카르보닐 함량 조사를 통한 단백질 산화 정도 역시 지질과산화 함량과 유사한 경향을 보였다.

Table 12. Effect of mYGJT on TBARS and protein carbonyl concentration of hepatic homogenate of rats fed hyperlipidemic diet

Treatment	Dose (mg/kg)	TBARS	Carbonyl concentration
		MDA nmole/mg protein	nM/mg protein
Normal		14.8±4.25 ^c	3.10±0.61 ^c
Control		33.9±2.67 ^d	5.17±0.53 ^d
mYGJT	100	30.7±3.19 ^{cd}	4.82±0.48 ^{cd}
	200	29.2±4.17 ^d	4.33±0.35 ^d

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different(p<0.05).

12. 간 조직 내 항산화효소계에 미치는 영향

Table 13에 제시된 바와 같이 간 조직중의 항산화효소계에 해당하는 superoxide dismutase(SOD)의 활성은 정상군이 2.25±0.32 U/mg protein으로 나타난 반면, 대조군은 정상군에 비하여 약 50% 정도 억제를 보였다. 이에 비해 육군자탕가감방

4주간 투여군에서는 대조군에 비하여 고지방 식이에 의하여 억제된 효소의 활성이 현저하게 회복되는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 glutathione peroxidase(GSH-Px) 및 catalase의 활성에서도 유사한 경향을 보였다.

Table 13. Effect of mYGJT on hepatic antioxidant enzymes activities of rats fed hyperlipidemic diet

Treatment	Dose (mg/kg)	SOD	GSH-Px	Catalase
		U/mg protein	Activity	
Normal		2.25±0.32 ^a	14.9±0.67 ^a	126.7±11.6 ^a
Control		1.29±0.25 ^b	7.43±0.22 ^b	70.5±7.96 ^b
mYGJT	100	1.37±0.33 ^{bc}	8.11±0.29 ^{bc}	81.5±9.43 ^b
	200	1.56±0.27 ^c	8.57±0.41 ^c	85.6±4.27 ^b

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different(p<0.05). SOD: superoxide dismutase one unit of SOD was defined as the which inhibited the reduced of alkaline DMSO-mediated cytochrome C by 50% GSH-Px: glutathione peroxidase: oxidized NADPH nmole/mg protein/min Catalase: decreased hydrogen peroxide µmole/mg protein

고찰

최근 우리나라는 서구화에 따른 식습관의 변화로 고지혈증에 기인하는 순환기계 질환으로 인한 사망률이 증가하고 있으며 이와 더불어 여러 질환의 발병도 급격한 증가를 경험하고 있다. 대부분의 질환들은 동물성 지방의 과다섭취로 인한 동맥경화(atherosclerosis), 심근경색(myocardial infarction), 고혈압(hypertension) 등과 같은 것으로²⁴⁾, 이러한 동물성 지방섭취는 식습관을 통해서 섭취하는 지방의 총량과 질(quality)에 밀접한 관련이 있는 것으로 확인된 바 있다. 또한 지방 변화로 인한 만성 퇴행성 질환의 원인 중 산화스트레스가 있는데 이는 체내의 활성산소에 의해 일어나며 노화와 당뇨, 고혈압, 암과 같은 여러 질병 발생에 관련이 있다는 사실이 보고된 바 있다²⁵⁾. 이러한 활성산소는 macrophage의 삼균작용, 오래된 단백질 제거 등에 이용되는 필수 불가결한 물질이지만, 반응성이 크기 때문에 다량 축적되면 생체 내 유해한 작용을 나타내기도 한다. 최근 활성산소에 의한 노화와 성인병 질환의 억제를 위해 항산화제의 개발 연구가 활발히 진행되어 효소계열의 예방적 항산화제인 SOD(superoxide dismutase), catalase, glutathione peroxidase 등과 천연 항산화제인 tocopherol, vitamin C, carotenoid, catechin, glutathione 등의 천연 항산화제 및 합성 항산화제인 BHA(Butylated Hydroxyanisole), BHT(Butylated Hydroxytoluene), Trolox-C 등에 관련된 연구가 보고된 바 있다. 또한 천연물 속의 각종 항산화성 비타민, 즉 vitamin E, vitamin C와 carotene 등은 식품에 들어있는 유지의 산패억제 작용을 하는 것은 물론이고 인체 내에서 항암, 관상동맥 질환의 예방, 백내장의 발생방지 등 생리적 기능이 확인된 바 있다. 또한 지질은 필수지방산을 공급하고 에너지원으로서 효율적인 체내 에너지 저장원인 영양소인 반면, 섭취량의 과다 및 활성산소에 의한 지방산 비율의 변화에 따라서 동맥경화증이나 심장순환계 질환 등의 여러 가지 만성질환을 일으키기도 한다. 이러한 심장질환이나 동맥경화증의 유발에는 혈중 지질 조성인 triglycerides, phospholipids, cholesterol 함량과 혈중 지단백질의 농도의 영향

이 아주 큰 것으로 알려지고 있으며²⁶⁾, 특히 지방의 양적인 문제 뿐만이 아니라 질적인 내용을 바탕으로 한 역학조사의 결과를 보게 되면, 심혈관 질환의 발생률은 지방의 섭취량이 많을수록 상관관계가 크며 섭취하는 유지의 종류도 큰 영향을 미치는 것으로 명백하게 밝혀져 있다²⁷⁾. 그 결과 1970년대 이후로 고혈압, 뇌졸중, 동맥경화증을 포함한 순환기계 질환이 안에 이어 우리나라 주요사망원인의 2위를 차지하여 선진국과 비슷한 양상으로 급속히 변했으며, 지난 20년 동안 순환기 질환으로 인한 사망률은 약 10배가 증가하여 전체 사망원인의 약 30%를 차지하게 되었다²⁸⁾.

韓醫學에서는 肥滿의 원인으로 氣虛, 濕, 痰, 熱, 過食肥甘膏粱厚味, 久臥, 久坐, 少勞, 素稟之體 등을 주로 들고 있다²⁹⁾. 그 병리기전에 관하여 歷代 醫家들은 肥滿이 氣虛한 상태에서 濕痰이 阻滯되어 발생하는 경우가 많다고 하였다. 한편 肥滿의 유형을 氣虛, 氣滯, 痰飲, 腎虛, 脾虛, 肝勝脾 등으로 표현하였는데, 氣虛형의 경우, 기가 부족하면 신진대사가 잘 이뤄지지 않고 지방대사의 기능도 떨어져 肥滿을 유발하며, 몸은 크지만 기운은 오히려 상대적으로 부족해 몸 안에 노폐물이 잘 배출되지 않고 몸속에 점점 축적되어 기운은 더욱 부족해진다. 氣滯형 肥滿은 스트레스를 받아 肥滿과 대소변 장애 등의 이상을 동반하며, 과도한 스트레스로 기 흐름의 장애가 생기면 지방대사, 혈액순환, 기순환이 정체되어 肥滿을 유발시킨다. 痰飲형의 경우, 기의 순환이 잘 안되면 혈액의 순환과 지방대사에 장애를 초래하여 肥滿을 신속하게 일으킨다. 腎虛형의 경우, 콩팥이 나빠지면서 몸이 붓고 쉽게 피로하며 체내 배설물이 제대로 배출이 안 되기 때문에 혈액 속에 독소가 침체되어 순환장애를 일으키는 경우가 많다. 脾虛형 肥滿은 소화기 장애로 인한 경우이다. 肝勝脾형 肥滿은 스트레스성 肥滿으로 몸무게의 변화가 심한 형이 많은데 오랜 시간 아무것도 먹지 않다가 갑자기 많이 먹게 되면 상대적으로 탈수 현상에 놓여 있던 수분과 염분의 재흡수 현상이 생겨 몸무게가 갑자기 증가한다고 하였다. 또한 『素問 通評虛實論』에서는 “肥貴人 卽膏粱之疾也.”이라 하여 肥滿의 원인을 제시하였고, 『傳習註女科』에서는 “身體肥滿 痰涎深多, 洩水化痰”이라하여 氣虛로 氣機가 不利하여 痰涎이 壅盛한 것으로 洩水, 化痰法을 사용해야 한다 하였으며, 治法은 化濕, 利水, 祛痰, 消導, 疎肝利膽, 健脾, 溫陽 등이 있으며 약물요법으로 防己黃芪湯, 五苓散, 二陳湯, 桃仁承氣湯, 防風通聖散, 大柴胡湯, 六君子湯 등의 處方이 사용되고 있다.

본 研究에 활용된 六君子湯加減方의 구성은 六君子湯과 五苓散을 合方과 加減한 것으로 六君子湯은 健脾養胃하는 四君子湯에 燥濕化痰하는 二陳湯을 合方한 方劑로⁶⁾ 『醫學正傳』에 “治痰挾氣虛發熱⁷⁾”이라 수록된 이후 許⁸⁾는 氣虛痰盛에 汪⁹⁾은 氣虛有痰에 사용하였고, 『景岳全書』에서는 “人多氣虛之證 然肥人多濕多滯 故氣道多有不利 若果痰氣壅滯, …(中略)… 宜四君六君.”¹⁰⁾이라 하여 氣虛多濕多滯한 肥人들의 治方으로 六君子湯을 사용해야 한다 인식하였고, 이 처방과 관련하여 裊¹¹⁾는 肥滿 마우스의 體重 및 血清含量變化에 미치는 영향, 민¹²⁾은 加味六君子湯이 白鼠의 肥滿에 미치는 영향, 이¹³⁾는 四君子湯, 二陳湯 및

六君子湯이 高脂血症에 미치는 영향에서 肥滿에 대한 효능을 입증하였다.

五苓散은 張¹⁴⁾의 『傷寒論』에서 太陽病 發汗後 大汗出 胃中乾 煩燥不得眠 欲得飲水者, 脈浮 小便不利 微熱 口渴者에 사용한다고 수록된 이후 水濕停滯와 水分代謝障礙로 인한 諸疾患에 널리 이용되어 왔으며⁸⁾, 化氣利水 滲濕하는 효능이 있어서 小便不利를 治療하는 중요한 方劑이다¹⁴⁾. 근래에는 泌尿器系 疾患 및 肥滿證의 治療에도 應用되고 있으며, 林¹⁵⁾은 肝과 副睪丸周圍의 脂肪組織, 血清脂質 및 尿中 hormone의 變化에 대하여, 李¹⁶⁾는 血清脂質에 미치는 영향, 金¹⁷⁾은 體重에 미치는 영향 등에서 肥滿치료 유의성이 있음을 입증하였다. 또한 金¹⁸⁾은 고지혈증 환자의 혈중지질과 항산화 효소체계에 미치는 영향研究, 朴¹⁹⁾은 식이성 고콜레스테롤 혈중 및 CCl₄ 독성에 미치는 영향을 논한 혈청 성분에 미치는 영향, 李²⁰⁾는 동맥경화성 병변에 미치는 영향에 관한 研究, 李 등²¹⁾은 초기진단 고지혈증 환자의 식습관 조사와 양과가루 섭취가 혈중지질에 미치는 영향을, 남 등²²⁾은 양과의 알코올 추출물이 고콜레스테롤혈증 환자의 지질 성상에 미치는 영향을 통하여 양과의 콜레스테롤 억제효능을 입증하였으며, 裊²³⁾는 “다이어트 샐러드와 소스만들기”에서 양배추 다이어트에 대하여 논하였다. 이에 著者는 肥滿을 치료하기 위하여 上記 處方과 食品을 合方하여 더욱 우수한 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각하였다.

본 실험에서는 기존의 이러한 研究결과를 바탕으로 육군자탕가감방으로 인한 혈청 지질의 변화 및 체중에 변화, 지방조직의 무게변화, 동맥경화 유발 물질인 phospholipid와 triglyceride의 변화를 확인하였고, cholesterol운반체인 HDL(high density lipoprotein), LDL(low density lipoprotein)의 변화를 통하여 동맥경화의 위험도 변화, 간 조직내의 지질 및 지질산화물인 malondialdehyde(MDA)양 및 thiobarbituric acid(TBA)와의 반응에 의한 TBARS(thiobarbituric acid reactive substance)의 양을 측정하였다. 또한 항산화 기능의 변화를 알아보기 위하여 SOD, GSH-Px 및 catalase의 활성도를 측정하여 육군자탕가감방의 고지혈증에 대한 전반적인 효능을 실험해보았다.

동물 병태 모델을 위해 poloxamer-407과 WR-1339(TWR)을 이용하였는데 poloxamer-407은 계면활성제의 하나로 간에서 cholesterol을 합성하는데 가장 중요한 효소 중의 하나인 HMG-CoA reductase의 활성을 증진시키며 순환하고 있는 혈중 triglyceride의 가수분해에 관여 하는 효소인 lipoprotein lipase를 강력히 억제함으로써 고지혈이나 고콜레스테롤증을 유발시키고, WR-1339는 세포의 lipase활성을 억제하여 혈액 내 triglyceride와 LDL을 증가시키고 high molecular apo B, free 그리고 ester-bound cholesterol, phospholipid, fatty acid의 농도를 증가시키며, 또한 세포내 lipase활성 억제에도 관여하여, 세포내 triglyceride의 축적을 증가시킨다. Poloxamer-407과 WR-1339(TWR)을 처리한 결과 콜레스테롤과 triglyceride의 양은 상당수 증가 하였지만 육군자탕가감방 투여군에서는 고지혈증 유발 시점 전에 처리함에도 불구하고, triglyceride의 경우에는 증가량이 6%, 16% 가량 감소하였고, T-cholesterol의 경우에도

증가량이 육군자탕가감방의 농도 의존적으로 감소하는 것을 알 수 있었다(Table 3, 4). 이로써 육군자탕가감방은 고지혈증 상황이 아니라도 섭취하면 고지혈증 발생을 일부 예방할 수 있다는 것을 예측할 수 있었다. 또한 고지방식으로 6주간 비만을 유도하여 육군자탕가감방투여군의 체중을 측정 하였는데, 4주간 육군자탕가감방 100 mg/kg, 200 mg/kg 투여군이 고지방식으로 비만을 유도한 대조군에 비하여 체중 증가량이 각각 62%, 69% 가량 감소하는 것으로 나타났다(Table 5). 다음으로 체지방량의 변동을 알아보기 위해 본 실험에서는 복강 및 부고환 주위의 지방 조직의 총 함량 변화를 관찰하였고, 그 결과 복강 및 부고환 주위의 체지방량 함량이 육군자탕가감방 섭취시 현저히 감소되었음을 관찰할 수 있었다(Table 6).

고지혈증은 소장에서 중성지방의 합성과 chylomicron의 분비 증가, 간장에서 중성지방의 합성 증가, VLDL, LDL-Cholesterol 합성 및 분비 증가, HDL-Cholesterol의 합성 감소 및 lipase의 활성 감소로 인한 말초 조직에서의 중성지방의 제거를 감소에 기인한다. 본 실험에서 고지방식으로 고지혈증이 유도된 rat의 간조직 및 혈중 total cholesterol, triglyceride의 변화를 측정 하였고, 혈중 HDL, LDL-cholesterol의 변동 및 육군자탕가감방 섭취시의 변화도 확인 하였다(Table 7, 8, 9). 그 결과 육군자탕가감방섭취군이 대조군에 비하여 HDL-cholesterol 함량의 감소는 줄어드는 것을 알 수 있었고 cholesterol, phospholipid 및 triglyceride 함량의 증가량은 약 2-3배 정도였지만 육군자탕가감방의 처리로 상당수 줄어든 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 혈중에서의 지질변동에 따른 결과로서, 육군자탕가감방이 조직의 지방함량, 조직 중 지방의 변동을 조절하는 효능에 기인한 것으로 여겨진다.

활성산소는 산소의 대사과정에서 산소가 불완전하게 환원되거나, 각종 물리적, 화학적, 환경적 요인에 의하여 안정한 분자상태에서 superoxide radical (O_2^-), hydroxyl radical ($HO\bullet$), hydrogen peroxide(H_2O_2), singlet oxygen(O_2^1) 등과 같은 반응성이 큰 불안정한 상태가 되는 것으로, 지질 과산화 반응 등 생체 내에 치명적인 악영향을 주기도 한다. 지질 과산화 반응은 불포화지방산(HDL)이 활성산소와 반응하여 산패된 기름의 형태를 띠는 것으로, 동맥경화등 여러 가지 구조장애를 일으키는 것이다. 활성산소는 정상적인 세포의 대사과정에서도 약간 생성되지만, 방어물질들이 활성산소를 제거해 줌으로써 독성작용을 나타내지 못하게 하고, 활성산소 제거 물질로는 superoxide dismutase (SOD), catalase, GSH-Px, glutathione peroxidase 등의 효소계와 alpha-tocopherol, ascorbic acid, 비타민 C, E, carotene 등의 비 효소계가 있다. 그러나 특정한 병리상태에서 과다한 활성산소의 생성으로 이들 방어물질들의 제거능력의 한계를 넘어설 경우에는 심각한 세포독성작용을 나타내는 것으로 알려져 있다³⁰⁾.

본 研究에서 고지방식을 이용 고지혈증을 유발시킨 후 육군자탕가감방을 투여한 고지혈증 rat의 혈중 hydroxyl radical의 생성과 superoxide dismutase(SOD)의 활성을 측정하였던 바, 고지혈증의 유발로서 hydroxyl radical의 생성은 증가되던 것이 육군

자탕가감방투여로 감소되었으며, superoxide anion을 환원시키는 효소인 SOD의 활성은 감소하던 것이 오히려 증가되는 것을 알 수 있었다(Table 11). 또한 간 조직 내의 항산화 효소인 SOD 외에 GSH-Px 및 catalase의 activity를 측정한 결과 실험군에서 농도 의존적으로 유의성 있는 증가를 나타내었다(Table 13). 또한 육군자탕가감방이 식이성 동맥경화를 유발한 동물 모델에서 간 조직의 지질 및 단백질 산화를 억제하는지 알아보기 위하여 TBARS(thiobarbituric acid reactive substance) 함량과 카르보닐 함량을 측정하였다. TBARS는 지질의 산화로 생성된 malondialdehyde(MDA)가 2-thiobarbituric acid(TBA)와 반응하여 생성된 물질로 과산화지질의 정도를 측정하는 지표이고, carbonyl기는 단백질이 활성산소와 결합 하여 생성되는 산물이며 이를 단백질 산화의 지표로 사용하였다³¹⁾. 단백질 카르보닐법은 지질과산화보다 예민한 방법으로 지적되고 있는데, 이는 지질이 산화되면 생성되는 유리기들이 생체내의 단백질과 반응하여 이들을 파괴시킴으로서 단백질 카르보닐 화합물이 생성되고, 이러한 단백질의 파괴는 지질 산화생성물인 hydroperoxide나 malondialdehyde보다 먼저 일어나며, 산화된 단백질이 비교적 안정하므로 측정이 용이하기 때문이다³²⁾. 그 결과 단백질 카르보닐 함량 및 TBARS는 육군자탕가감방을 투여한 군이 대조군에 비해 증가가 억제되는 것을 알 수 있었다(Table 12). 이는 콜레스테롤로 인해 증가된 rat의 간 조직의 지질과산화를 육군자탕가감방의 항산화물질이 이를 억제한 것으로 사료된다. 또한 MDA의 함량도 육군자탕가감방의 농도 의존적으로 증가량이 감소하는 것을 알 수 있었다(Table 10). 하지만 MDA는 지질의 과산화 산물이나 지질 과산화에 비례하여 생산되는 물질이 아니므로 지질의 과산화 경향을 보는데 의의를 가질 수 있을 것이다.

이상의 결과를 종합하면, 고지방식을 이용하여 비만을 유도한 흰 쥐에 육군자탕가감방을 투여한 경우 체지방과 관련된 혈액학적 지표와 간장 내의 지질 변화 등에서 농도 의존적으로 항비만과 항고지혈 효과가 유의하게 나타났는데, 여기에는 활성산소의 해독제 등도 유의성 있는 영향을 미쳤던 것으로 사료된다. 이로서 육군자탕가감방은 향후 비만과 관련된 질병의 치료에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대되며, 이에 사용된 개별 약물에 대한 평가와 유전적 비만을 가진 병태모델을 통한 실험, 비만 조절인자에 대한 기전의 研究, 사람을 대상으로 한 임상실험에서의 유의성 등에 대한 研究가 계속 이어져야 할 것으로 기대된다.

결 론

육군자탕가감방 에탄올추출물(mYGJT)의 비만 및 고지혈증 억제 효과를 실험적으로 입증하기 위하여 고지방식으로 유도된 고지혈증 흰쥐에 체중의 변화, 복강 및 부고환 주위 지방의 중량 변화, 혈액학적 변화 및 간장조직 내 지질의 변화, 항산화물질의 활성 변화 등을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

육군자탕가감방은 비만유도 흰 쥐의 체중증가 및 복강 내 지질, 부고환 주위 지방의 중량 등을 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시켰다. 육군자탕가감방은 혈청 내 total lipid,

phospholipid, triglyceride, total cholesterol, LDL, AI(Atherosclerosis Index)는 유의성 있게 감소시켰으며, HDL은 거의 정상수준까지 증가시켰다. 육군자탕가감방은 간장 내 total lipid, triglyceride, cholesterol을 감소시켰다. 육군자탕가감방은 혈액 내 MDA 및 hydroxyl radical을 감소시켰고, SOD (superoxide dismutase)는 증가시켰다. 육군자탕가감방은 간장내 MDA와 protein carbonyl을 감소시킨 반면, SOD, GSH-Px, catalase는 증가시켰다.

이상의 결과로 보아 육군자탕가감방이 비만 및 고지혈증 유도 흰쥐에 대하여 고지혈증 유발 물질 의 감소 외에 항산화작용을 통한 비만 및 고지혈증에 대한 유의적 억제 효과도 보임으로써 향후 이 분야에 대한 임상적 활용이 가능할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Peter, G. Kopelman. Obesity as a problem. Nature. 04(6778). pp 635-643, 2000.
- 남수연, 신재호, 최병기, 김경욱, 김경래, 송영득, 임승길 외. 한국인 성인 비만증에서 당대사에 따른 렙틴 농도와 인슐린 및 체지방 분포와의 상관성. 대한비만학회지 8(2), 1999.
- Kurt, J. Isselbacher. Harrison's 내과학. 서울, 도서출판 정담, p 480, 1987.
- Kopelman, P.G., Stock, M.J. Clinical Obesity. Blackwell Oxford. 1998.
- 한방재활의학과학회. 한방재활의학과학. 서울, 군자출판사, pp 349-362, 2003.
- 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 서울, 의성당, p 216, 1998.
- 虞搏. 醫學正傳. 北京, 人民衛生出版社, p 133, 1981.
- 許浚. 東醫寶鑑. 南山堂, p 134, 1983.
- 汪昂. 醫方集解. 서울, 杏林出版社, pp 228-230, 1977.
- 張介賓. 經岳全書(上). 서울, 大星文化社, pp 211-212, 1997.
- 배인태. 六君子湯이 肥滿마우스의 體重 및 血清含量變化에 미치는 영향. 동신대학교석사학위논문, 2004.
- 민병화. 加味六君子湯이 白鼠의 肥滿에 미치는 영향. 동의대학교석사학위논문, 2000.
- 이승재. 四君子湯, 二陳湯 및 六君子湯이 高脂血症에 미치는 영향. 원광대학교석사학위논문, 1993.
- 張仲景. 仲景全書. 서울, 大星文化社, pp 156-158.
- 임영호. 五苓散의 肥滿誘導 白鼠의 肝과 副睪丸周圍의 脂肪組織, 血清脂質 및 尿中 Hormone의 變化에 관한 研究. 경희대학교박사학위논문, 1998.
- 이상태. 五苓散이 肥滿誘導 흰쥐의 體重 및 血清脂質에 미치는 영향. 동국대학교석사학위논문, 1997.
- 김정연. 五苓散과 五苓散가창출이 肥滿 白鼠의 體重에 미치는 영향. 원광대학교석사학위논문, 1994.
- 김양하. 양파의 섭취가 고지혈증 환자의 혈중지질과 항산화 효소체계에 미치는 영향. 창원대학교석사학위논문, 2007.
- 박평심. 양파가 흰쥐의 식이성 고콜레스테롤 혈증 및 CCl₄ 독성에 미치는 영향. 조선대학교석사학위논문, 1991.
- 이왕동. 양파가 흰쥐의 혈청성분에 미치는 영향. 명지대학교 석사학위논문, 1991.
- 이경혜, 김양하, 박은주, 조성래. 초기진단 고지혈증 환자의 식습관 조사와 양파가루 섭취가 혈중지질에 미치는 영향. 한국식품영양학회지 37(5), 2008.
- 남경희, 백현옥, 최태운, 윤순규, 박세원, 정효자. 양파의 알코올 추출물이 고콜레스테롤혈증 환자의 지질 성상에 미치는 영향. 한국영양학회지 40(3), 2007.
- 배태자. 다이어트 샐러드와 소스만들기. 예신, 2003.
- Kim, B.R., Kim, J.D., Ham, S.S., Choi, Y.S., Lee, S.Y. Effects of spice added natto supplementation on the lipid metabolism in rats. J Korean Soc Food Sci Nutr 24: 121-126, 1995.
- Baynes, J.W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Diabetes 40: 405-412, 1991.
- Park, K.S. Metabolic syndrome. Korean Diabetes Journal 7: 37-44, 2006.
- Emst, J.S., Alice, H.L., Stetania, I.F., Judith, R.M., Jose, M.O. Lipoprotein, nutrition, aging and atherosclerosis. Am J Clin Nutr 61: 726-730, 1995.
- Kang, H.K., No, J.K., Sung, D.Y., Kim, N.D., Lee, K.H., Kim, K.W., Choi, W.C., Yim, K., Yoo, B.P., Jung, H.Y. Effects of aging and dietary restriction on free radical generation and GSH/GSSG level in rat testis. J Gerontol 7: 92-97, 1997.
- 全國韓醫科大學 再活醫學科學教室. 東醫再活醫學科學, 서울, 書苑堂, pp 473-477, 570-576, 581-582, 1995.
- Hammond, B., Hess, M.L. The oxygen free radical system : Potential mediator of myocardial injury. J Am Coll Cardiol 6: 215-220, 1985.
- Garrison, W.M. Reaction mechanism in radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. Chem Rev 87: 381-398, 1987.
- Urano, S., Asai, Y., Makabe, S., Matsuo, M., Izumiyama, N., Ohtsubo, K., Endo, T. Oxidative injury of synapse and alteration of antioxidative defense systems in rats, and its prevention by vitamin E. European J. Biochemistry. 245(1):64-70, 1997.